

嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长动力学方程的应用^{*}

柳建设 张艳华

(中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

摘要: 基于 Monod 模型推导出了 A. f 的生长动力学方程模型, 采用 Gauss-Newton 算法确定了在不同初始条件下细菌生长的动力学参数, 即最大比生长速率 μ_m 、Monod 常数 K 及 R_0 。通过在不同初始条件下细菌生长特性的研究, 得到了相应初始生长条件下以限制性底物亚铁离子浓度为表征的生长动力学方程, 理论上揭示了动力学参数变化对细菌生长的影响规律, 其中生长动力学方程的数值模拟与实验数据相吻合。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; 生长特性; 动力学参数; 生长动力学方程; 数值解

The Application of Kinetic Equation for Growth of Acidithiobacillus Ferrooxidans

LIU Jian-she, ZHANG Yan-hua

School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, ChangSha 410083, China

ABSTRACT: A kinetic model for growth of A. ferrooxidans was deduced on the basis of the Monod equation, the values of kinetic parameters (i.e. Monod constant K, maximum growth rate μ_m and R_0) in different initial experiment conditions were calculated by using Gauss-Newton algorithm. Through the researching of the growth characteristics of under the conditions, the kinetic equation for growth of A. ferrooxidans, which was represented by restricted substrate ferrous ion concentration under the corresponding conditions, was obtained, which, theoretically, revealed the influence of the kinetic parameters on the growth of A. ferrooxidans, and the numerical simulation in kinetic equation for growth of A. ferrooxidans was proved to be consistent with the experimental data.

Key words: Acidithiobacillus ferrooxidans; Kinetic model parameter; Growth behavior; Growth velocity equation; numerical solution

浸矿的速率与产率都受到细菌生长的影响, 因此针对细菌生长动力学的研究有助于揭示细菌浸矿机理。从 40 年代至今, 许多微生物生理学和生物化学工程学工作者提出了许多关于微生物生长速率的数学模型^[1], 主要有细菌生长底物(亚铁离子及硫化矿等)氧化动力学和细菌生长动力学^[2-3]。在模型的建立过程中他们认为影响细菌生长的因素很多, 除微生物的遗传背景外, 还有如培养基的 pH 值、温度、主要营养物质的浓度、氧化还原电势、溶液中溶解氧的浓度等环境条件^[4]。在实际生产中, 细菌的氧化活性和生长速率不但受外界综合因素的影响, 而且受自身生长代谢的反馈作用^[5]。细菌对二价铁离子氧化是细菌浸出过程的基础, A. f 主要以氧化 Fe^{2+} 来获得生长过程所需能量, 由于细菌体内各种氧化还原酶的参与, 催化了 Fe^{2+} 铁离子的氧化过程, 各种影响酶催化活性的因素(底物浓度, pH, 以及 $Fe(II)$ 的传质等)对 Fe^{2+} 氧化及细菌的生长都有影响。通过对细菌与二价铁作用规律的研究, 了解细菌氧化二价铁的本质及细菌生长繁殖规律, 建立相应的细菌生长动力学模型, 将有助于找到细菌生长的最佳条件, 确定浸出效率的关键变量。

本文以浸矿微生物中起主要作用嗜酸氧化亚铁硫杆菌为研究对象, 以 Monod 方程为模型基础, 引入浸矿微生物的生长以 Fe^{2+} 浓度为限制性底物等假设^[6], 推导并建立了 A. f 菌生长动力学模型, 利用该模型, 采用 Gauss-Newton 算法确定了细菌生长的动力学参数, 包括最大比生长速率 μ_m 、Monod 常数 K 及 R_0 , 得到了不同初始培养条件下细菌的生长速度方程。我们可以避免繁琐的直接测定细菌生物量的方法更方便快捷

的确定细菌生长的动力学方程, 得到细菌在对数生长期唯一的限制性生长底物二价铁随时间的变化规律。

1 嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长动力学方程

1.1 嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长动力学模型

微生物的生长过程是应用细胞中的酶系, 把底物通过复杂的生物反应转化成新的细胞及其代谢产物的复合反应, 根据上述反应研究微生物生长动力学, 至少要对 3 个状态变量进行描述, 所以我们在能够方便、快捷、准确地得到模型所需的实验数据的基础上, 尽可能简化参数, 进行合理假设, 建立适合特定条件的数学模型^[7]。在此原则上本文采用均一化的非结构模型, 建立过程如下:

由假设可得细菌成分用一个参数即菌体浓度 X 随时间的变化表示:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

A. f 菌的生长则使用 Monod 方程来描述, 即

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K + S} \quad (2)$$

将(2)代入(1)式, 得

$$\frac{dX}{dt} = \mu = \frac{\mu_m SX}{K + S} \quad (3)$$

设 Y 为得率系数, 即每氧化 1 克的铁所产生的细菌质量 (g/g), A. f 菌的生长速度与 Fe^{2+} 的消耗(被 A. f 菌氧化)速度存在比例关系:

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 50374075); 国家重点基础研究发展规划项目资助(973), (No. 2004CB619200)

作者简介: 柳建设, 男, 湖南长沙人, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物冶金、生物电化学方面的研究。

Tel: 86-13786127842; E-mail: zyhehoesu@163.com

(收稿日期: 2006-02-18 接受时间: 2006-03-13)

$$\frac{dX}{dt} = \frac{YdS}{dt} \quad (4)$$

将(3)、(4)两式联系起来,得

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_m SX}{Y(K+S)} \quad (5)$$

令 X_0 和 S_0 分别为初始得细菌浓度和底物的 Fe^{2+} 浓度,由(5)式有

$$X = X_0 + Y(S_0 - S) \quad (6)$$

将(6)式代入(5)式,得到

$$\mu_{mt} = \ln \frac{S - (X_0/Y + S_0)}{S_0 - (X_0/Y + S_0)} + \frac{K}{X_0/Y + S} \left[\ln \left(\frac{S - (X_0/Y + S_0)}{S} \right) - \ln \left(\frac{S_0 - (X_0/Y + S_0)}{S_0} \right) \right] \quad (9)$$

令 $R_0 = X_0/Y + S_0$, 代入(9)式,即

$$\mu_{mt} = \ln \frac{S - R_0}{S_0 - R_0} + \frac{K}{R_0} \left[\ln \left(\frac{S - R_0}{S} \right) - \ln \left(\frac{S_0 - R_0}{S_0} \right) \right] \quad (10)$$

上式就是以 Fe^{2+} 浓度(底物浓度)来表述的 *A.t.f* 菌生长动力学方程,表明了生长速率与底物浓度之间的对应关系。

1.3 嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长动力学方程的数值解

定义(11)式为嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长动力学参数的目标函数:

$$F(S) = \frac{K}{R_0} \ln \frac{S_0 \{S - R_0\}}{S \{S_0 - R_0\}} + \ln \frac{S - R_0}{S_0 - R_0} - \mu_{mt} \quad (11)$$

为求得生长动力学方程的三个目标参数定义目标函数为实函数方程组:

$$F_i(\mu_m, R_0, K) = 0 \quad (12)$$

式中 S_0, S, t 由实验数据给出, R_0, K, μ_m 为待求解的三个常数。计算时需选取三组实验数据,由(12)式组成三元非线性方程组,借用 Matlab 语言编制相应程序,合理设定收敛精度^[8],并用 Gauss-Newton 算法求解此三元非线性方程组^[9],由此可以得出嗜酸氧化亚铁硫杆菌在不同条件下的生长动力

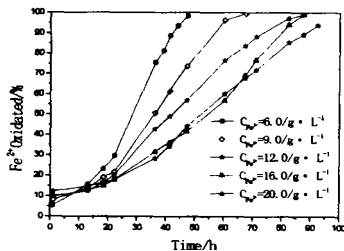


图1 不同初始 $Fe(II)$ 浓度下 $Fe(II)$ 氧化生长曲线

Fig. 1 the Growth curve at different initial $Fe(II)$ concentration

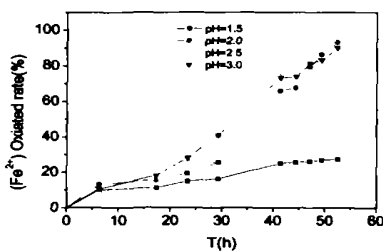


图3 不同初始 pH 值 $Fe(II)$ 氧化生长曲线

Fig. 3 the growth curve at different initial pH vs time

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu_m [X_0 + Y(S_0 - S)]S}{Y(K + S)} \quad (7)$$

式(7)为以底物(Fe^{2+})浓度为变量的生长动力学模型。

1.2 嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长动力学方程的建立

对(7)式直接进行积分:

$$\int_0^t \mu_m dt = - \int_{S_0}^{S_t} \frac{Y(K + S)}{X_0 + Y(S_0 - S)} dS \quad (8)$$

学方程。

2 实验方法与结果

嗜酸氧化亚铁硫杆菌 YNATF1 是采于云南某矿区原矿水,经固体平板分离纯化后的菌株(经分子生物学 16SrDNA 序列比对与标准菌同源性 99%)。实验中使用 9K 培养基对细菌进行摇瓶振荡的分批培养,培养基组分为 $(NH_4)_2SO_4$, 3.00g; KCl, 0.10g; K_2HPO_4 , 0.50g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.50g; $Ca(NO_3)_2$, 0.01g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 44.7g^[10]按此配方加蒸馏水配溶液 1000ml。用 9K 培养基装入 250ml 锥形瓶中,然后接入正处于对数期生长的细菌 10ml(接种量为 10%),然后用 160 转/分的恒温摇床 30℃ 培养以提供细菌恒定的温度和充足的氧气。定时取样分析其亚铁离子浓度,绘制出 *A.t.f* 生长曲线及亚铁离子浓度随时间变化曲线。二价铁离子浓度用重铬酸钾法滴定; pH 值用 PHSJ-4A 型 pH 计测量;计数用双目电子显微镜和血球计数板直接计数菌液中细菌数。

改变初始条件二价铁浓度、pH 值,得到铁氧化生长曲线和亚铁浓度随时间变化的数据如图 1-4 所示:

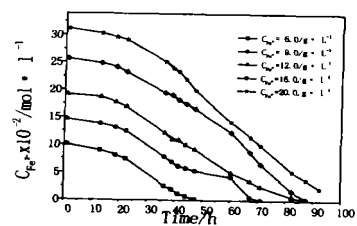


图2 不同初始 $Fe(II)$ 浓度下 $Fe(II)$ 浓度变化曲线

Fig. 2 Plot of concentration of $Fe(II)$ vs time

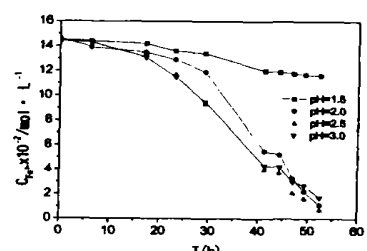


图4 不同初始 pH 值 $Fe(II)$ 浓度变化曲线

Fig. 4 Plot of concentration of $Fe(II)$ vs time

3 实验结果的数值拟合

3.1 不同初始条件下细菌的生长动力学模型参数的求解

应用细菌生长动力学模型对表 1 中 *A.t.f* 菌对数生长期的

实验数据进行三元非线性方程组的数值求解。选用合适的算法是模型参数估计获得成功的重要因素,本文采用 Gauss-Newton 算法,计算时先赋 R_0, K, μ_m 一组初始值,用计算机编制程序经过多次迭代后,最后给出一组满足合理收敛精度的解,

如表 1 所示:

表 1 不同初始条件下 At. f 菌生长动力学参数计算值
Table 1 the simulating kinetics parameters at different experiment conditions

Experiment No.	Initial concentration of Fe(II) / g·L ⁻¹	pH	K / g·L ⁻¹	μ _m / h ⁻¹	R ₀ / g·L ⁻¹
1	6.0	2.0	0.8028	0.3100	2.0139
2	9.0	2.0	0.6168	0.2572	3.0240
3	12.0	2.0	0.1888	0.0160	15.8682
4	16.0	2.0	0.5780	0.0241	19.9968
5	20.0	2.0	1.2001	0.0174	21.7043
6	9.0	1.5	6.7085	0.0086	17.5923
7	9.0	2.0	0.5962	0.0838	4.5808
8	9.0	2.5	0.5089	0.0228	12.0850
9	9.0	3.0	0.0912	0.0536	5.9963

由表 1 所示, 我们可以看出不同的初始条件下细菌生长具有不同的反应常数 K, K 是表征细菌的特征常数之一, K 的大小与微生物细胞对限制性底物的依赖性的大小成反比。当 pH 值不变时, 随着亚铁浓度的增大, K 值先是由大变小, 然后由小变大, 而对 μ_m 的影响比较小。当初始 Fe²⁺ 浓度为 12.0g·L⁻¹, pH= 2.0 时, 有一最小值 K= 0.1888g·L⁻¹, 此条件细菌最适合生长。

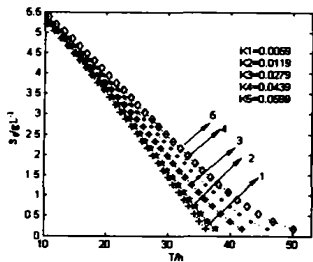


图 6 K 值变化时模型的理论预示
Fig. 6 Effect of K on concentration of Fe(II) as a function of time by model

由 1- 3 图可以看出在其中任何两种参数不变时, 随着 K 值减小, 细菌对 Fe²⁺ 的亲合力越强, 亚铁氧化速率越大; K 的大小与微生物细胞对限制性底物的依赖性的大小成反比。随着 μ_m 值增大, 细菌的生长速度加快, 亚铁氧化速率也加快; 当 R₀ 值(某种程度代表细菌的初始浓度) 增大, 亚铁氧化速率加快。

3.2 不同初始条件下细菌生长动力学方程

将表 1 中通过计算所得的 R₀, K, μ_m 的数值代入公式 (10), 得到不同初始条件下 At. f 菌的生长动力学方程分别为:

$$t_1 = \left\{ 0.3986 \ln \frac{S_0(S - 2.0139)}{S(S_0 - 2.0139)} + \ln \frac{S - 2.0139}{S_0 - 2.0139} \right\} / 0.31 \quad (13)$$

$$t_2 = \left\{ 0.2039 \ln \frac{S_0(S - 3.0240)}{S(S_0 - 3.0240)} + \ln \frac{S - 3.0240}{S_0 - 3.0240} \right\} / 0.2572 \quad (14)$$

$$t_3 = \left\{ 0.0119 \ln \frac{S_0(S - 15.8682)}{S(S_0 - 15.8682)} + \ln \frac{S - 15.8682}{S_0 - 15.8682} \right\} / 0.016 \quad (15)$$

$$t_4 = \left\{ 0.0289 \ln \frac{S_0(S - 19.9968)}{S(S_0 - 19.9968)} + \ln \frac{S - 19.9968}{S_0 - 19.9968} \right\} / 0.0241 \quad (16)$$

当初始底物浓度不变时, 随着 pH 的增大, 其 K 值呈减小趋势, 当 pH= 1.5 时 K 值最大, 细菌最不易生长, 当 PH= 2.5 时 k 值最小。pH= 3.0 时发现培养基易发生 Fe³⁺ 的水解反应形成黄钾铁矾沉淀, 说明初始 pH 过高或过低都不利于细菌的生长, 其中低 pH 对细菌的抑制作用显著。只要在偏离适宜的 pH 值的情况下, 就会引起细菌原生质膜正负电荷的改变, 这种改变同时又会引起原生质膜对个别离子渗透性的变化, 从而影响细菌对营养物质的吸收、酶的形成以及代谢的途径, 延长细菌生长的迟缓期, 甚至会抑制细菌的生长。

当改变其中任一参数, 其余两个参数恒定时, 利用该模型对底物二价铁浓度变化随时间变化进行理论预示如图 5- 7。

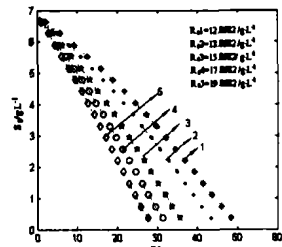


图 5 R₀ 值变化时模型的理论预示
Fig. 5 Effect of R₀ on concentration of Fe(II) as a function of time by model

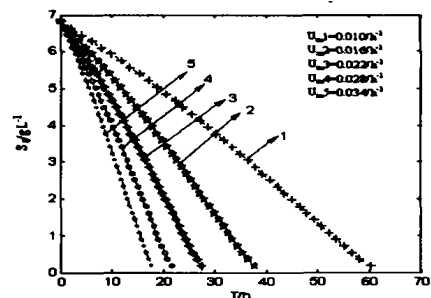


图 7 μ_m 值变化时模型的理论预示
Fig. 7 Effect of μ_m on concentration of Fe(II) as a function of time by model

$$t_5 = \left\{ 0.0553 \ln \frac{S_0(S - 21.7043)}{S(S_0 - 21.7043)} + \ln \frac{S - 21.7043}{S_0 - 21.7043} \right\} / 0.0174 \quad (17)$$

$$t_6 = \left\{ 0.3813 \ln \frac{S_0(S - 17.5923)}{S(S_0 - 17.5923)} + \ln \frac{S - 17.5923}{S_0 - 17.5923} \right\} / 0.0986 \quad (18)$$

$$t_7 = \left\{ 0.1302 \ln \frac{S_0(S - 4.5808)}{S(S_0 - 4.5808)} + \ln \frac{S - 4.5808}{S_0 - 4.5808} \right\} / 0.0838 \quad (19)$$

$$t_8 = \left\{ 0.0421 \ln \frac{S_0(S - 12.0850)}{S(S_0 - 12.0850)} + \ln \frac{S - 12.0850}{S_0 - 12.0850} \right\} / 0.0228 \quad (20)$$

$$t_9 = \left\{ 0.0152 \ln \frac{S_0(S - 5.9963)}{S(S_0 - 5.9963)} + \ln \frac{S - 5.9963}{S_0 - 5.9963} \right\} / 0.0536 \quad (21)$$

方程 (13) 至 (21) 分别揭示了不同初始条件下 A. f 菌在对数生长期生长过程中的底物 Fe²⁺ 浓度随时间的变化。据此, 可以计算出在对数生长期任一时刻限制性底物 Fe²⁺ 的浓度。

3.3 实验结果的数值拟合

由嗜睡氧化亚铁硫杆菌生长动力学方程的数值拟合曲线与实验数据比对结果如下图 8、9 所示。其中各点为实验数据, 曲线为拟合曲线。

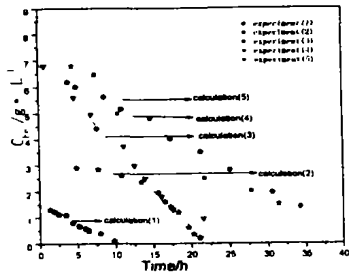


图 8 不同初始 Fe(II) 条件下二价铁随时间的拟合曲线的拟合曲线

Fig. 8 The fitting curve of growth speed equations in varied initial Fe(II) concentration

通过对生长动力学参数拟合得细菌对数生长期的数值拟合曲线与实验数据吻合较好, 从中我可以方便快捷的得不同初始条件下 A. f 在对数生长期任一时刻限制性底物 Fe^{2+} 的浓度。

4 结论

①在 Monod 模型的基础上, 本文通过假设推导出 A. f 的生长动力学方程模型。并应用 Gauss-Newton 算法确定了模型中细菌生长的动力学参数, 包括最大比生长速率 μ_m 、表征细菌特征常数之一的 K 及 R_0 值。

②不同的铁离子浓度具有不同的反应常数。随着亚铁浓度的增大, K 值先是由大变小, 然后由小变大, 当初始 Fe^{2+} 浓度为 $12.0 g \cdot L^{-1}$, pH= 2.0 时, 有一最小值 $K= 0.1888 g \cdot L^{-1}$, 证明此条件细菌最适合生长。当亚铁浓度不变时, 初始 pH 过高或过低都不利于细菌的生长, 其中低 pH 对细菌的抑制作用显著。pH= 1.5 时, A. f 菌的生长明显受抑制, 此条件下该模型可以考虑修正。

③建立了不同初始条件下 A. f 菌的生长速度方程, 揭示了在对数生长期生长过程中的底物 Fe(II) 浓度与时间的关系, 据此, 可以计算出在对数生长期任一时刻限制性底物 Fe^{2+} 的浓度。

附: 文中各参数的物理意义为:

Y: 比例常数, 即每氧化 1 克的铁所产生的细菌质量, (g/g);

S_0 : A. f 菌指数生长期限制性底物的起始浓度, (g/L);

S: A. f 菌指数生长期在时间 t 时的底物浓度, (g/L);

K: 饱和常数, (g/L);

μ_m : A. f 菌的最大特征生长速度, (h^{-1});

t: A. f 菌生长过程底物浓度由 S_0 变化至 S 的间隔时间, (h)。

参考文献

[1] Jose Manuel Bomez, Domingo Cantero. Kinetic study of biological ferrous

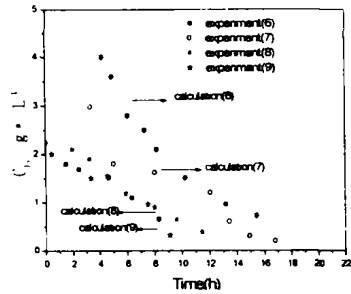


图 9 不同初始 pH 值条件下二价铁随时间的拟合曲线的拟合曲线

Fig. 9 The fitting curve of growth speed equations in varied initial pH

sulphate oxidation by iron-oxidizing bacteria in continuous stirred tank and packed bed bioreactors[J]. Process biochemistry, 2002, 4: 867-865

[2] Boon M, Ras C, Heijnen J. J. The ferrous iron oxidation kinetics of thiobacillus ferrooxidans in batch cultures[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51: 813- 819

[3] Breed AM. The effect of temperature on the continuous ferrous- iron oxidation kinetics of a predominantly Leptospirillum ferrooxidans culture. Biotechnol[J]. Bioeng, 1999, 65: 44- 45

[4] C. J. N. Dempers I, A. W. Breed., G. S. Hansford. The kinetics of ferrous- iron oxidation by Acidithiobacillus ferrooxidans and Leptospirillum ferrooxidans effect of cell maintenance[J]. Biochemical Engineering journal, 2003, 4: 337- 346

[5] Jones CA, Kelly DP. Growth of thiobacillus ferrooxidans on ferrous iron in chemostat culture: influence of product and substrate inhibition[J]. Jchem. TechBiochnol, 1983, 33(B): 241- 261

[6] Nemat M, Harrison STL, Webb C, Hansford GS. Biological oxidation of ferrous sulphate Thiobacillus ferrooxidation: a review on the kinetic aspects[J]. Biochem Eng J, 1998, 1: 171- 190

[7] 柳建设. 硫化矿物生物提取及腐蚀电化学研究[M]. 中南大学博士学位论文, 2002

[8] 王沫然. MATLAB 与科学计算[M]. 北京: 电子工业出版社, 2003. 9

[9] 于寅. 高等工程数学[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2001. 10

[10] Silverman MP, Lundgren DG. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium Ferrobacillus ferrooxidans. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yield[J]. J Bacteriol, 1959, 77: 642- 7

[11] Nikolov LN, Karamanev DG. Kinetics of the ferrous iron oxidation by resuspended cells of Thiobacillus ferrooxidans[J]. 1992, 8: 252- 255

[12] Gabriel Meneane. bacterial oxidation of ferrous iron by Acidithiobacillus ferrooxidans in the pH range 2.5- 7.0, Hydrometallurgy[J], 2003: 149 - 158